

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 44 12 893 A 1

⑤1 Int. Cl.⁶
G 01 N 33/50
B 01 L 3/00
G 01 N 21/01

②1 Aktenzeichen: P 44 12 893.2
②2 Anmeldetag: 14. 4. 94
④3 Offenlegungstag: 19. 10. 95

DE 44 12 893 A 1

BEST AVAILABLE COPY

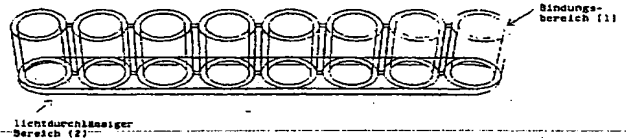
⑦1 Anmelder:
Cytech Biomedical, Inc., Sarasota, Fla., US

⑦4 Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

⑦2 Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

⑤4 Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen von organischen Substanzen wie Biomolekülen

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung von analytischen Bestimmungen von Substanzen, insbesondere organischen Substanzen wie Biomolekülen, die eine nicht-monolithische Struktur hat und mindestens einen Bindungsbereich (1) zum Binden der zu untersuchenden Substanz und mindestens einen lichtdurchlässigen Bereich (2) enthält. Die Bereiche bestehen aus Polymermaterialien, die gleich oder verschieden sein können. Bei der vorliegenden Vorrichtung kann der Bindungsbereich (die Bindungsbereiche) unabhängig von dem lichtdurchlässigen Bereich einer Aktivierungsbehandlung unterzogen werden.
Diese Vorrichtung eignet sich besonders für die photometrische Analyse bei der Bestimmung von Biomolekülen in organischen Proben.



DE 44 12 893 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
BUNDESDRUCKEREI 08.95 508 042/265

8/29

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung von analytischen Bestimmungen von Substanzen, insbesondere organischen Substanzen wie Biomolekülen, die eine nicht-monolithische Struktur hat und die mindestens einen Bindungsbereich (1) zum Binden der zu untersuchenden Substanz und mindestens einen lichtdurchlässigen Bereich (2) enthält. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung eine Vorrichtung für die photometrische Analyse, deren Bindungsbereich ausgezeichnete Bindungseigenschaften hat.

Zur Bestimmung kleiner Mengen von Biomolekülen in organischen Proben werden Verfahren wie Immunoassays, Hybridisierung, DNA/RNA-Bindungsassays, etc. eingesetzt. Diese Verfahren beruhen auf immunologischen Reaktionen, Antigen-Antikörperreaktionen, Ausnutzung der Eigenschaften von Nukleinsäuren z. B. bei der Hybridisierung, Blottingtechniken oder PCR, die zur Charakterisierung dieser Substanzen geeignet sind. Zum Nachweis der zu analysierenden Probe werden üblicherweise Enzyme und farbverändernde Mittel eingesetzt.

Üblicherweise werden für diese Verfahren Vorrichtungen als Probenbehälter wie Probenröhrchen, Mikrotiterplatten oder ähnliches aus Polymermaterial eingesetzt. Die herkömmlichen Behälter sind monolithisch, d. h. aus einem Stück, gestaltet, so daß der Bindungsbereich und der lichtdurchlässige Bereich identisch sind.

Die zu untersuchende Substanz, z. B. ein Antigen in einem Immunoassay, wird bei der Durchführung der Untersuchung zunächst durch Bindung an die Oberfläche des Probenbehälters immobilisiert. Es wird angenommen, daß es sich hierbei nicht um eine durch eine chemische Reaktion bewirkte Bindung handelt, sondern um eine Bindung, die durch physikalische oder nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen dem Polymermaterial des Behälters und der zu untersuchenden Substanz bewirkt wird.

Durch spezifische Reaktionen mit Enzymen oder farbverändernden Mitteln können die zu analysierenden Substanzen qualitativ und quantitativ bestimmt werden, indem z. B. die Intensität der Farbänderung mittels Photometrie gemessen wird.

Beispielsweise macht sich das sogenannte ELISA-Verfahren (Enzyme Linked Immunosorbution Assay) diesen Effekt zunutze, das im einzelnen von E. Macy al. in "Enhanced ELISA: How to measure less than 10 picograms of a specific protein in less than 8 hours" F.A.S.E.B. Journal, Bd. 2, S. 3003-3009 (1988) und von S.F.De. St. Groth in "The evaluation of limiting dilution assays" J. Immunol. Meth., Bd. 83, S. 89-95 (1985) beschrieben worden ist.

Da diese Verfahren auf der Messung von Licht beruhen, das die gefärbte Lösungen durchdringt, können nur Probebehälter aus durchsichtigen, d. h. lichtdurchlässigen Materialien verwendet werden. Durch dieses Erfordernis ist aber die Auswahl an geeigneten Materialien stark eingeschränkt.

Aus der Beschränkung auf durchsichtige Polymermaterialien folgt, daß auch nur beschränkte Bindungseigenschaften und -möglichkeiten zur Verfügung stehen: das heißt, es können keine nicht-lichtdurchlässigen Materialien verwendet werden, selbst wenn ihre speziellen Bindungseigenschaften vorteilhaft wären.

Da auch Aktivierungsbehandlungen der Oberfläche zur Verbesserung der Bindungseigenschaft die optischen Eigenschaften des Materials nicht beeinträchtigen

dürfen, waren diese bisher ebenfalls nur beschränkt anwendbar.

Folglich waren bisher durch die Notwendigkeit der Verwendung von lichtdurchlässigen Materialien Faktoren, die das Bindungsvermögen polymerer Träger kennzeichnen, nämlich Kapazität, Affinität und Stabilität, in einem engen Bereich festgelegt.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine Vorrichtung zur analytischen Bestimmung, insbesondere zur analytischen Bestimmung von Biomolekülen, zur Verfügung zu stellen, die den zuvor beschriebenen Beschränkungen nicht unterliegt und für deren Bindungsbereich ein beliebiges Polymermaterial verwendet werden kann.

Insbesondere ist es Aufgabe der Erfindung, eine derartige Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, deren Bindungsbereich aus einem beliebigen Polymermaterial bestehen kann und die sich besonders gut zur photometrischen Bestimmung eignet.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine derartige Vorrichtung zur Verfügung zu stellen, bei der der Bindungsbereich aktiviert werden kann ohne den lichtdurchlässigen Bereich zu beeinträchtigen.

Diese Aufgaben werden durch eine Vorrichtung zur analytischen Bestimmung gelöst, die eine nichtmonolithische Struktur hat und die mindestens einen Bindungsbereich (1) und mindestens einen lichtdurchlässigen Bereich (2) enthält.

Erfindungsgemäß können diese Bereiche aus verschiedenen Materialien bestehen und unabhängig voneinander hergestellt werden, wobei der bzw. die Bindungsbereich(e) unabhängig von dem (den) lichtdurchlässigen Bereich(en) aktiviert werden kann (können).

Im folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Zeichnungen im einzelnen erläutert.

Fig. 1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung im Aufriß.

Fig. 2 ist eine Draufsicht der Ausführungsform gemäß Fig. 1.

Fig. 3 zeigt einen Querschnitt der erfindungsgemäßen Ausführungsform nach Fig. 1 und 2.

Fig. 4 ist eine Draufsicht der erfindungsgemäßen Ausführungsform nach Fig. 1.

Fig. 5 zeigt eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die auf einer Seite mit einer Griffflasche zur besseren Handhabung versehen ist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung besteht im wesentlichen aus zwei unabhängigen Bereichen, nämlich einem Bindungsbereich (1) und einem lichtdurchlässigen Bereich (2).

Das heißt, im Gegensatz zu den herkömmlichen Vorrichtungen, die einheitlich (monolithisch) ausgebildet sind, hat die erfindungsgemäße Vorrichtung einen nicht-monolithischen Aufbau, der aus mindestens einem Bindungsbereich (1) und mindestens einem lichtdurchlässigen Bereich (2) besteht, die von einander unabhängig sind und aus unterschiedlichen Materialien bestehen können.

Der lichtdurchlässige Bereich (2) besteht aus einem durchsichtigen Polymermaterial z. B. Polystyrol, Polycarbonat, Polyvinylchlorid usw. Unter diesen Materialien ist Polystyrol besonders bevorzugt.

Auch können Copolymere und Polymerblends dieser Materialien untereinander oder mit anderen Monomeren, z. B. Butadien, verwendet werden, solange die optischen Eigenschaften nicht beeinträchtigt werden. Besonders bevorzugt ist ein Copolymeres von Styrol von

Butadien.

Anders als bei herkömmlichen monolithischen Vorrichtungen zur Durchführung von Bestimmungen von Biomolekülen kann erfindungsgemäß für den Bindungsbereich (1) ein beliebiges Polymermaterial verwendet werden, da die exakte photometrische Bestimmung durch den separaten lichtdurchlässigen Bereich, der aus einem lichtdurchlässigen Polymermaterial besteht, sicher gestellt ist.

Vorzugsweise ist das Polymermaterial für den Bindungsbereich hydrophob und nicht porös, so daß die Anbindung von Biomolekülen und anderen Reagenzien besser kontrolliert werden kann. Geeignete Polymermaterialien umfassen z. B. Polymere und Copolymere von Polystyrol, Polypropylen, Polybutadien, Polyvinylchlorid, Polyamid, Polycarbonat, Epoxide, Methacrylate, Polyamid, Polyester, Polyäther, Fluorpolymere oder Polymelamin. Es kann jede Art von Copolymer, wie z. B. statistische, alternierende, Block- oder Propfpolymere, verwendet werden.

Erfindungsgemäß werden vorzugsweise Polymerblends und Copolymere eingesetzt, da diese leicht mit Lösungsmittel aktiviert werden können, wie es nachstehend im einzelnen erläutert werden wird.

Der Bindungsbereich (1) kann mindestens einen aktivierten Bereich, der durch Vergrößerung der Oberfläche erhalten wird, enthalten. Dadurch erhält der Bindungsbereich verbesserte Kapazität und Affinität zum Binden von Biomolekülen und die resultierenden Bindungen sind stabiler.

Da die erfindungsgemäße Vorrichtung einen nicht-monolithischen Aufbau hat kann der Bindungsbereich (1) getrennt von dem lichtdurchlässigen Bereich (2) aktiviert werden, so daß der lichtdurchlässige Bereich nicht durch die Aktivierungsbehandlung beeinträchtigt wird. Die Aktivierung kann vor dem Verbinden der beiden Bereiche erfolgen. Daher können erfindungsgemäß auch Aktivierungsmethoden, wie Sandstrahlen und Photoätzen, eingesetzt werden, die bei herkömmlichen Vorrichtung nicht anwendbar waren, da sie die optischen Eigenschaften beeinträchtigen.

Die Aktivierung der Oberfläche des Bindungsbereichs (1) kann mechanisch z. B. mittels Schleifen, sandstrahlen, Photoätzen usw. erfolgen. Man nimmt an, daß durch diese mechanischen Verfahren die Polymermatrix nicht auf molekularer Ebene verändert wird, sondern daß das Bindungsvermögen durch Erhöhung der verfügbaren Oberfläche des Bindungsbereichs und durch Änderung der Kohäsion von wässriger Lösung an der Oberfläche des Bindungsbereichs verbessert wird.

Vorzugsweise wird das Polymermaterial des Bindungsbereichs (1) jedoch durch Behandlung der Oberfläche mit einem oder mehreren Lösungsmittel(n) aktiviert. Bevorzugte Lösungsmittel sind solche, die die Polymermoleküle an der Oberfläche des Bindungsbereichs (1) teilweise auflösen, erodieren oder derart angreifen, daß dadurch die Polymermatrix aufgeschlossen wird, so daß eine Polymermatrix erhalten wird, die mit den Biomolekülen binden kann. Für diesen Zweck einsetzbare Lösungsmittel umfassen z. B. Äther, Alkohole, Ketone, Aldehyde, Säuren, Basen, Olefine, lineare und cyclische Kohlenwasserstoffe, halogenierte Kohlenwasserstoffe und andere Lösungsmittel, die teilweise die Bestandteile des Trägers auflösen können.

Zur Aktivierung von einem oder mehreren Bereichen des Bindungsbereichs (1) wird die Vorrichtung eine ausreichend lange Zeit in das Lösungsmittel eingetaucht, um die Oberfläche aufzurauen, wodurch die Polymer-

matrix aufgeschlossen wird.

Das Lösungsmittel kann auch durch Aufsprühen, Aufstreichen oder auf andere Weise auf die Vorrichtung aufgetragen werden.

Die Zeit, die für die Aktivierung erforderlich ist, variiert in Abhängigkeit des bestimmten Lösungsmittels und des Polymersystems, das verwendet wird. Für die meisten Anwendungen ist eine Aktivierungszeit bis zu einer Minute ausreichend.

Den erfindungsgemäßen verwendeten Polymermaterialien für den Bindungsbereich (1) und den lichtdurchlässigen Bereich (2) können je nach Bedarf übliche Zusätze wie Farbstoffe, Verarbeitungshilfsmittel, Stabilisatoren, Vernetzungsmittel, Weichmacher, Füllstoffe usw. zugesetzt werden.

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Verbindung der beiden Bereiche, die aus unterschiedlichen Polymermaterialien bestehen. So ist es wesentlich, daß die Verbindung bzw. Nahtstelle glatt und einheitlich ist, da Risse oder Unebenheiten nichtspezifische Adhäsion und/oder eine unzureichende Spülung bewirken, so daß die Wirksamkeit und Zuverlässigkeit der Tests, die durchgeführt werden sollen, beeinträchtigt werden.

Wie vorstehend beschrieben, ist die erfindungsgemäße Vorrichtung nicht monolithisch, sondern besteht aus verschiedenen Bereichen, nämlich mindestens einem Bindungsbereich (1) und mindestens einem lichtdurchlässigen Bereich (2), die aus unterschiedlichen Materialien bestehen können und unabhängig voneinander hergestellt werden können.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung hat sich insbesondere das sogenannte Zweistufen-Spritzgießverfahren als geeignet erwiesen, da damit eine glatte und einheitliche Verbindung bzw. Nahtstelle zwischen den beiden Bereichen erhalten werden kann.

Bei dem Zweistufen-Spritzgießverfahren wird zunächst der eine Teil (Bereich) der Vorrichtung gebildet, anschließend wird dieser Teil in eine zweite Form gegeben und der zweite Teil (Bereich) wird rund um den ersten Teil herum gebildet. Im Ergebnis wird eine Vorrichtung erhalten, die aus verschiedenen Teilen (Bereichen) besteht, die aus verschiedenen Polymermaterialien gebildet sein können, wobei die verschiedenen Bereiche mittels Formpressen miteinander einheitlich verbunden werden können.

Eine einheitliche und glatte Verbindung zwischen den verschiedenen Bereichen kann auch durch nahtlose Klebstoffverbindung, Ultraschallschweißen oder andere Verfahren zum Verbinden von verschiedenen Teilen erfolgen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann eine beliebige für die Durchführung der Tests geeignete Form haben. So kann der Bindungsbereich (1) rechteckig, quadratisch, zylinderförmig, als Röhrchen usw. ausgestaltet sein.

Der lichtdurchlässige Bereich (2) kann hierbei eine Seite der Vorrichtung bilden, z. B. kann sie den Bodenfläche bilden.

Vorzugsweise ist der Verbindungsbereich zylinderförmig ausgestaltet, wobei der lichtdurchlässige Bereich (2) den Zylinderboden ausbildet.

Wie in den Fig. 1 bis 5 gezeigt, besteht in einer erfindungsgemäß besonders bevorzugten Ausführungsform die Vorrichtung aus einer Vielzahl von aneinandergereihten Zylinderbereichen (1), die auf einer einheitlichen Bodenplatte aus lichtdurchlässigem Polymermaterial (2) angeordnet sind.

Weiter können auch mehrere Reihen von zylinderförmigen Bindungsbereichen auf einer Bodenplatte, die den lichtdurchlässigen Bereich (2) bildet, angeordnet sein. Zur besseren Handhabung kann die erfindungsgemäße Vorrichtung mit Griffbereichen wie z. B. Griffflächen versehen sein (siehe Fig. 5).

Desweiteren ist es auch möglich, die Vorrichtung mit einem Randbereich zu versehen, der zur Kennzeichnung der einzelnen Bindungsbereiche, die aneinander gereiht sind, beschriftet sein kann.

Die Abmessungen der Vorrichtung sind nicht kritisch. Sie können je nach Verwendungszweck frei gewählt werden, solange die optische Eigenschaften nicht beeinträchtigt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann auf Grund ihres nicht-monolithischen Aufbaus besonders vorteilhaft für Verfahren zur Bestimmung von Biomolekülen wie z. B. Proteinen, Aminosäuren, Peptiden, Polypeptiden, Proteinen, Nukleinsäuren, Aminen, Aminosäuren, Monoaminen, Nukleotiden, Polynukleotiden, Polysaccharide, Lipopolysaccharide usw. eingesetzt werden.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung von analytischen Bestimmungen von Substanzen mit nicht-monolithischer Struktur, enthaltend mindestens einen Bindungsbereich (1) zum Binden der zu untersuchenden Substanz und mindestens einen lichtdurchlässigen Bereich (2).
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei der Bindungsbereich (1) und der lichtdurchlässige Bereich (2) jeweils aus Polymermaterialien bestehen, die gleich oder verschieden sein können.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Bindungsbereich (1) und der lichtdurchlässige Bereich (2) jeweils aus einem Copolymer oder Polymerblend bestehen.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei der lichtdurchlässige Bereich (2) aus Polystyrol, Polyvinylchlorid oder Polycarbonat besteht.
5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der lichtdurchlässige Bereich (2) aus einem Copolymer aus Styrol und Butadien besteht.
6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Bindungsbereich (1) oder ein Teil (Teile) davon einer Aktivierungsbehandlung unterzogen worden ist (sind).
7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Bindungsbereich (2) oder ein Teil (Teile) davon durch Behandlung mit einem Lösungsmittel aktiviert worden ist (sind), die das Polymermaterial teilweise lösen.
8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Bindungsbereich (1) oder ein Teil (Teile) davon durch Anwendung mechanischer Mittel aktiviert worden ist (sind).
9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Bindungsbereich (1) zylinderförmig ausgestaltet ist und der lichtdurchlässige Bereich (2) die Bodenplatte des Zylinders bildet.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, wobei eine Vielzahl von miteinander verbundenen zylinderförmigen Bindungsbereichen (1) auf einer Bodenplatte, die den lichtdurchlässigen Bereich (2) bildet, angeordnet sind.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

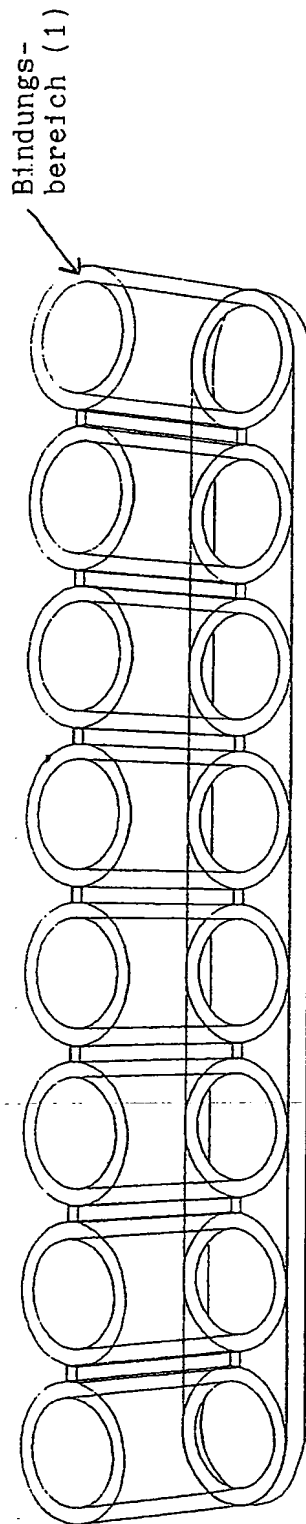


Fig. 2

lichtdurchlässiger
Bereich (2)

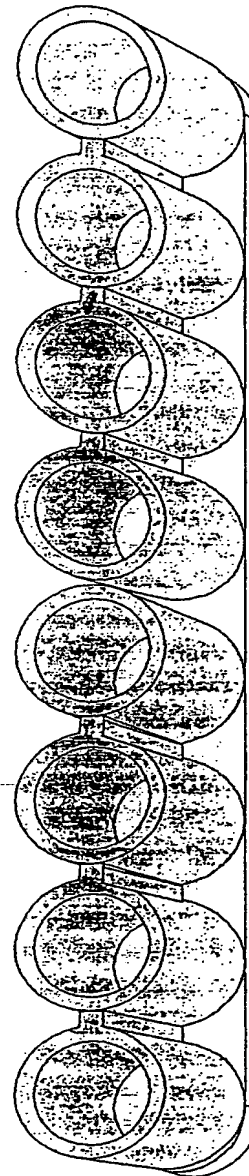


Fig. 3

Seitenansicht

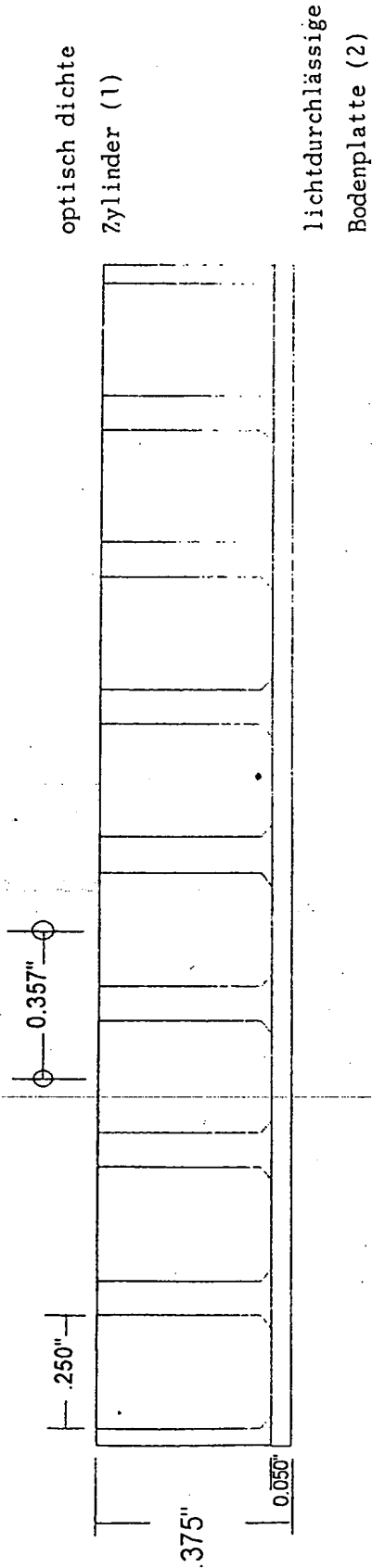
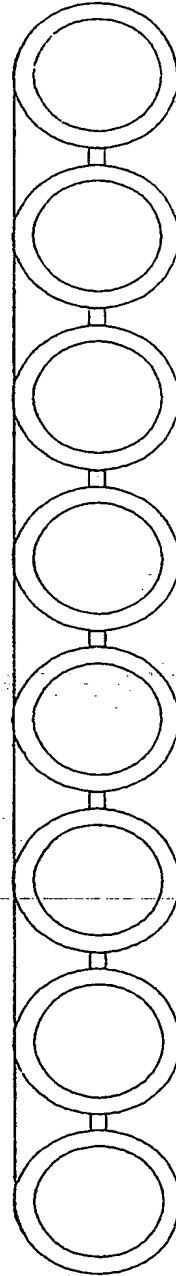


Fig. 4

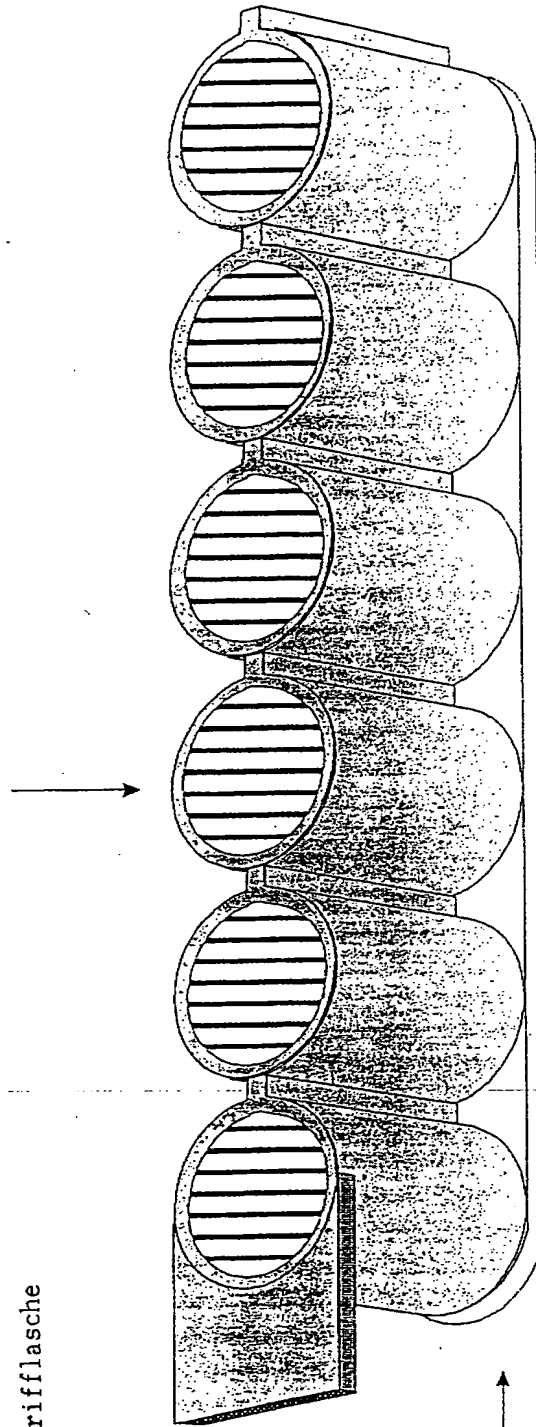
Draufsicht



Optisch dichte Zylinder (1)

Fig. 5

Griffflasche



lichtdurchlässige
Bodenplatte (2)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

PAGE BLANK (SP10)